

罗马生菜的组织培养及无性系建立

乔旭 刘玲 高洋 李铁松 姜长阳*

(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

摘要 以罗马生菜的嫩茎为外植体诱导愈伤组织, 选取诱导率最高的嫩茎愈伤组织为材料, 进行愈伤组织的分化培养和不定芽的根培养, 建立起罗马生菜的无性系。结果表明, 1/2MS+NH₄H₂PO₄ 50mg/L+BA 0.5mg/L+2,4-D 1.2mg/L 为诱导罗马生菜嫩茎形成具有分化能力愈伤组织理想培养基; 1/2MS+AgNO₃ 0.4mg/L+BA 0.2mg/L+NAA 0.1mg/L 是罗马生菜颗粒状愈伤组织和不定芽分化培养的理想培养基; 1/3MS+IAA 0.6mg/L 是试管苗生根培养的理想培养基; 移植于田间的试管苗生长旺盛、根系发达、鲜菜产量提高16%。

关键词 罗马生菜; 组织培养; 无性系

中图分类号 S636.2.043 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2008)04-0005-02

生菜(*Lactuca Sativa L. var. roman. Hort*)是莴苣的一个变种, 又称叶用莴苣, 而罗马生菜是生菜的一个品种, 属于菊科山莴苣属一年生或二年生草本栽培植物^[1,2]。罗马生菜是由国外培育的杂交种, 大连郊区农民的近年引种证明, 该品种因具有生长速度快、产量高、抗逆性强、易于栽培、叶子鲜食、口感好而颇受农民和消费者欢迎; 但是由于是杂交种, 国内无法制种, 生产用种只能依赖于进口, 从而限制了生产的发展。为此, 我们进行了罗马生菜的组织培养和无性系建立的研究, 以期获得试管苗, 满足人们生产和消费的需要。

1 材料与方法

1.1 材料及灭菌

将大连市甘井子区农民种植于田间生长非常旺盛的罗马生菜嫩茎采回来后, 放入250mL的磨口广口瓶中, 用清水冲洗约20min; 再用0.05%的安利液振荡洗涤10min左右后, 用无菌水洗涤2次, 然后将其移到超净工作台上。用75%的乙醇振荡灭菌约30s后, 迅速用无菌水洗涤2次, 再用0.05%的HgCl₂溶液振荡灭菌2min, 接着用0.025%的HgCl₂溶液振荡灭菌16min, 最后用无菌水振荡洗涤5次, 即获得无菌材料。

1.2 培养条件

以附加不同浓度的细胞分裂素、生长素的MS、1/2MS、1/3MS为培养基, 固体培养基琼脂含量为4.5g/L, 愈伤组织诱导和分化幼芽的培养基含蔗糖30g/L, 生根培养基为10g/L, 培养基pH值5.8~6.0; 培养温度25±1℃, 愈伤组织诱导进行暗培养。芽的分化和根的诱导培养均于光照条件下进行, 光照时间12h/d, 光照强度3000Lx左右; 炼苗在日光温室大棚中进行, 光照强度4000Lx左右, 温度20±6℃。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对罗马生菜愈伤组织诱导的影响

将无菌嫩茎去皮后, 切成0.2~0.4cm块状, 接种在附加不同浓度的2,4-D、NAA的MS+NH₄H₂PO₄ 50mg/L+BA 0.5mg/L和1/2MS+NH₄H₂PO₄ 50mg/L+BA 0.5mg/L培养基上暗培养, 每种培养基接种80块材料。培养30d左右, 在多数培养基上能诱导生长出较为松散的愈伤组织。继续培养到60d观察统计, 结果见表1。在添加上述2种生长素的培

养基上都能形成愈伤组织; 但其浓度不同对愈伤组织的诱导率不同。一般情况下诱导率随着浓度的提高而增大; 但当2种生长素配合使用且浓度同时超过1.2mg/L时, 愈伤组织诱导率有降低的趋势。可见, 高浓度生长素抑制了愈伤组织的生长。在2,4-D与NAA单独使用, 且浓度达到和超过1.2mg/L的培养基上, 愈伤组织的诱导率达到了100%。观察发现, 在2,4-D浓度为1.2mg/L的1/2MS+NH₄H₂PO₄ 50mg/L+BA 0.5mg/L培养基上, 不仅愈伤组织的诱导率达100%、生长速度快, 而且所生长愈伤组织为淡黄色的颗粒状。这种愈伤组织具有分化能力^[3,4]。把这种愈伤组织在相同的培养基上进行继代培养, 连续培养6代, 除了每代的培养时间为50d外, 继代培养的愈伤组织形状保持不变, 平均每代生长增殖率为32倍。这种培养结果表明, 1/2MS+NH₄H₂PO₄ 50mg/L+BA 0.5mg/L+2,4-D 1.2mg/L这一培养基为诱导罗马生菜嫩茎形成具有分化能力愈伤组织的理想培养基。

表1 不同浓度生长素对罗马生菜愈伤组织诱导的影响

生长素浓度//mg/L	NAA	2,4-D	MS		1/2MS	
			诱导数//颗	诱导率//%	诱导数//颗	诱导率//%
0	0	0	0	0	0	0
0.4	0	0	18	22.50	25	31.25
0.8	0	0	39	48.75	44	55.00
1.2	0	0	80	100	80	100
1.6	0	0	80	100	80	100
2.0	0	0	80	100	80	100
0	0.4	0	47	58.75	52	65.00
0	0.8	0	70	87.50	68	85.00
0	1.2	0	80	100	80	100
0	1.6	0	80	100	78	97.50
0	2.0	0	80	100	80	100
0.4	0.4	0	51	63.75	68	85.00
0.8	0.8	0	80	100	80	100
1.2	1.2	0	66	82.50	75	93.50
1.6	1.6	0	45	56.25	66	82.50
2.0	2.0	0	27	33.75	44	55.00

2.2 愈伤组织的分化培养与不定芽的分化继代培养

将在1/2MS+NH₄H₂PO₄ 50mg/L+BA 0.5mg/L+2,4-D 1.2mg/L培养基上继代培养的嫩茎淡黄色颗粒状愈伤组织分散成颗粒状后, 接种到附加不同浓度BA、NAA的1/2MS+AgNO₃ 0.4mg/L、1/3MS+AgNO₃ 0.4mg/L进行愈伤组织的分化培养。每种培养基接种200个愈伤组织颗粒。接种后15d左右, 在有的培养基上可见开始分化。随着培养时间的

* 通讯作者

收稿日期 2007-12-27

延长,在有的培养基上逐渐形成分化出高矮不等的不定芽。50d时观察统计,结果见表2。在只加不同浓度BA培养基上和浓度为0.5mg/L的BA与浓度为1mg/L的NAA配合使用培养基上,以及浓度为1mg/L的BA与不同浓度为的NAA配合使用培养基上,颗粒状愈伤组织不能分化。而在BA含量为0.2mg/L、NAA含量为0.1mg/L的1/2MS+AgNO₃ 0.4mg/L培养基上,不仅颗粒状愈伤组织的分化率达100%,而且分化的不定芽长势旺盛。观察还表明,培养30d左右,在这一培养基上由颗粒状愈伤组织分化培养的不定芽的基部,还能分化出3~5个不定芽,使之形成丛生状分化不定芽。把上述培养的不定芽从基部切开形成单芽后,接种到相同培养基上分化继代培养,培养45d会分化出生长较旺盛丛生不定芽,平均分化增殖率为5.8倍。经过连续11次的继代培养,其分化率和丛生不定芽的长势基本保持不变。由此可见,1/2MS+AgNO₃ 0.4mg/L+BA 0.2mg/L+NAA 0.1mg/L是罗马生菜颗粒状愈伤组织和不定芽分化培养的理想培养基。

表2 不同浓度的植物激素对愈伤组织不定芽芽分化的影响

植物激素//mg/L		1/2MS			1/3MS		
BA	NAA	分化数//颗	分化率//%	长势	分化数//颗	分化率//%	长势
0	0	0	0		0	0	
0.2	0	0	0		0	0	
0.2	0.1	200	100	+++	120	62.0	++
0.2	0.2	144	77.0	++	89	34.5	++
0.2	0.5	86	43.0	+	38	9.0	+
0.2	1.0	45	22.5	+	10	5	+
0.5	0	0	0		0	0	
0.5	0.1	88	44.0	+	56	28.0	++
0.5	0.2	67	33.5	+	22	11.0	+
0.5	0.5	6	3.0	+	9	4.5	+
0.5	1.0	0	0		0	0	
1.0	0	0	0		0	0	
1.0	0.1	0	0		0	0	
1.0	0.2	0	0		0	0	
1.0	0.5	1.0	1.0		0	0	

注:+++为长势非常旺盛;++为长势旺盛;+为长势一般。

2.3 不同浓度植物生长素对生根的影响

将培养的丛生不定芽从基部剪下,接种到含有不同浓度生长素的1/3MS培养基上进行生根培养。每种培养基接种100个不定芽。接种7~10d后,部分培养基能形成可见的根原基。25d时观察统计,结果见表3。在附加不同浓度IBA和不加生长素的生根培养基上不能诱导生根,而在附加不同浓度IAA、NAA的生根培养基上均可诱导生根。但不同浓度NAA生根率不及IAA。在含有浓度为0.6mg/L的IAA生根培养基上,不仅生根率为100%、平均每株生根数为7.4条,而且生根试管苗株高为5~6cm、生长旺盛。在这一培养基上进行了6次生根培养试验,结果试管苗的生根率、长势等保持不变。上述结果说明,1/3MS+IAA 0.6mg/L是罗马生菜生根培养的理想培养基。

2.4 试管苗的移栽

选择根系正常、生长旺盛的试管苗培养瓶,将瓶塞打开,于温室中炼苗4d左右,取出试管苗,立刻用清水洗去基

表3 不同浓度生长素对生根培养的影响

生长素//mg/L			生根数//颗	生根率//%	平均生根数(条)//株
IAA	IBA	NAA			
0	0	0	0	0	0
0.2	0	0	48	48	3.9
0.4	0	0	79	79	5.2
0.6	0	0	100	100	7.4
0.8	0	0	77	77	5.8
1.0	0	0	11	11	2.2
0	0.2	0	0	0	0
0.4	0	0	0	0	0
0.6	0	0	0	0	0
0.8	0	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0	0
0	0.2	13	13	1.9	0
0	0.4	85	85	4.7	0
0	0.6	24	24	3.8	0
0	0.8	4	4	1.3	0
0	0	1.0	2	2	1.0

部的培养基,移栽到分别铺有6~7cm厚河沙、珍珠岩、炉灰渣和肥沃园土4种不同移栽基质的温室苗床上。在温度18~26℃、湿度90%以上、无直射光照的条件下,15d左右开始正常生长。30d时观察统计发现,以炉灰渣和河沙为基质的苗床上试管苗成活率达94%以上,且生长旺盛、整齐、根系发达。移栽试验重复了5次,结果基本一致。这说明炉灰渣和河沙是罗马生菜试管苗移栽的理想基质。

4月下旬至5月上旬,把在温室中移栽成活的试管苗小批量的移植到田间,移植成活率几乎为100%。移植苗20d左右开始迅速生长,60d时收割的鲜菜比同期播种的实生苗增产16%。对田间移植成活的试管苗和播种的实生苗进行观察还表明,移植苗不仅生长非常旺盛,而且根系增加了1.5~2.0倍,叶色浓绿。

3 讨论

虽然国内已有叶用莴苣组织培养研究的报道^[5-10],但迄今未见国外引进品种以嫩茎为材料的生菜组织培养及无性系建立的报道。本研究以引进的生菜品种——罗马生菜的嫩茎为材料,成功地进行了愈伤组织诱导、愈伤组织分化、试管苗生根、试管苗移栽及移植的研究,建立起罗马生菜的无性系。由此证明,罗马生菜的非分生组织细胞也具有全能性。

以不定芽分化的方法进行分化繁殖培养,45d分化增殖率为5.8倍。按照这个速度进行繁殖,1年的繁殖率为5.88,约为130万个。说明用这种方法进行快速繁殖,可以达到快速繁殖的目的,满足生产的需要。同时,这项技术也证明,把植物组织培养快速繁殖技术应用于引进优良杂交种,既能避免经常引种造成麻烦和高额的花费,又能保证在自身无法制种的情况下,使引进的优良杂交种得到推广应用。

移植到田间的试管苗,不仅生长非常旺盛、根系增加了1.5~2.0倍,叶色浓绿,而且60d时收割的鲜菜比同期播种的实生苗增产16%。移植的试管苗产量的提高、生长旺盛,一方面与培养的材料生长非常旺盛有关,另一方面与试管苗的根系非常发达有关。

4 参考文献

(下转第9页)

表2 黄瓜产量调查

处理	3行分别摘瓜数量/kg				折单产 t/hm ²	比对照增产 t/hm ²	增产 率/%
	第1行	第2行	第3行	平均每行			
试验	100.3	101.2	96.9	99.5	114.89	31.92	39.8
对照	76.2	72.3	64.9	71.1	82.15	-	-

3.5 对棚内二氧化碳浓度影响

因无二氧化碳浓度测量仪器,没有具体的调查数据。从黄瓜植株长势调查发现,采用该技术的植株节间短而粗、长势壮、叶片厚、表面有光泽、墨绿色;而对照棚黄瓜植株明显

(上接第6页)

- [1] 中国科学院中国志编辑委员会.中国植物志[第八十卷(第一分册)][M].北京:科学出版社,1998.
- [2] 李书心.辽宁植物志(下册)[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1991.
- [3] 安利佳,姜长阳.植物组织培养导论[M].大连:辽宁师范大学出版社,1996.
- [4] 胡尚连,王丹.植物生物技术[M].西安:西安交通大学出版社,2004.
- [5] 李丹,山红艳,邵素清.美国叶用莴苣的组织培养与植株再生[J].植物生理学通讯,2003,39(2):148.

(上接第7页)

表1 不同振荡频率与光照强度对鸡腿菇菌丝生长的影响

因素水平	菌丝干重/g/100mL	显著性	较优水平
振荡频率	50	1.00	
//次/min	70	1.15	** 70
	90	0.65	
光照强度	无光(黑色布套)	0.90	黑暗
	弱光(白色布套)	0.85	
	强光(无布套)	0.80	

注:每个水平重复3次。

暗较弱光、室内散射光更能满足菌丝生长的要求。

2.2 不同含糖度对鸡腿菇菌丝干重的影响与菌丝生长对糖的消耗

配制含糖度分别为1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%的6个不同水平的培养液,在25℃条件下接种培养6d后测定培养液的含糖度,检查鸡腿菇生长中对糖的消耗,结果见表2。试验表明,接种前后培养液的糖消耗率3%左右,说明鸡腿菇菌丝生长对糖消耗受培养液含糖度的影响不大;但菌丝干重与培养液含糖度呈正相关。

表2 不同含糖度对鸡腿菇菌丝干重的影响与菌丝生长对糖的消耗

处理(培养前含糖度)/%	菌丝干重/g/100mL	培养后含糖度/%	糖消耗率/%
1.0	0.75	0.960	4.0
1.5	0.80	1.475	2.5
2.0	0.82	1.970	3.0
2.5	0.90	2.469	3.1
3.0	1.10	2.973	2.7
3.5	1.11	3.480	2.0

2.3 不同梯度的pH值培养液对菌丝生长的影响

配制pH值为2、3、4、5、6、7、8不同梯度的培养液,在25℃条件下摇瓶培养6d测培养液pH值,检查生长后培养液pH值的变化,结果见表3。试验表明,培养液pH值对菌丝生长影响很大,对比接种培养前后培养液pH值的变化情况,发现鸡腿菇接种在不同pH值梯度的培养液中培养,

长势弱、节间长而细、叶片黄而薄,这些现象证明了试验棚内二氧化碳浓度高,光合作用强。

4 结论

冬暖棚采用秸秆生物反应堆及疫苗技术栽培黄瓜,能提高棚内气温1.65℃、地温高3.81℃;提早摘瓜上市12d,延长摘瓜20d以上;平均每天每棵黄瓜植株比对照增长高度0.2cm左右;增加棚内二氧化碳浓度,提高黄瓜产量,增产幅度30%以上。

- [6] 朱路英,刘玲,孟祥栋.叶用莴苣离体培养和植株再生[J].园艺学报,2002,29(2):181-182.
- [7] 高昌勇,尚宏芹.叶用莴苣组织培养研究[J].菏泽学院学报,2004,26(4):61-62.
- [8] 李鹏飞.结球莴苣顶芽及叶片组织培养[J].华南农学院学报,1980,1(3):39-42.
- [9] 钟钟贤.结球生菜的组织培养[J].植物生理学通讯,1988,24(6):37-38.
- [10] 刘选明.结球生菜叶片器官发生的研究[J].湖南农学院学报,1990,1(3):233-240.

最后都将培养液pH值调至6.5左右。表明鸡腿菇菌丝代谢具有调整pH值的功能,菌丝在pH值3~8都能生长,生长最适pH值为5~6。

表3 不同梯度的pH值培养液对菌丝生长的影响

处理(培养液pH值)	菌丝干重/g/100mL	培养后培养液pH值
2	0.2	6.0
3	0.5	6.0
4	1.0	6.2
5	1.5	6.3
6	1.8	6.5
7	1.0	6.7
8	0.5	6.7
9	0.3	6.7

2.4 不同菌种在原种瓶与栽培袋中的对比试验

按前述每组10次重复,记载菌丝长满时间,取10次重复的平均值,按天计算,结果见表4。结果表明,摇瓶菌种较固体菌种在固体基质上能多点萌发,菌丝可多方向延伸,生长均匀、快速,能提早8~10d满瓶(袋),生长速度在原种瓶要快0.425cm/d,在栽培袋快0.406cm/d,使用摇瓶菌种接种固体基质制作的原种,能兼具液体菌种和固体菌种的优点。

表4 不同菌种在原种瓶与栽培袋中菌丝满瓶、满袋时间与长速

处理	原种瓶菌丝满瓶时间与长速		栽培袋菌丝满袋时间与长速	
	满瓶时间/d	生长速度/cm/d	满袋时间/d	生长速度/cm/d
液体菌种	15.5	0.908	22	1.272
对照(固体菌种)	24	0.583	32.3	0.866
差异	8.5d	0.425	10.3	0.406

3 参考文献

- [1] 马瑞霞,姚献华,魏志华.白色金针菇液体菌种生产技术研究[J].中国食用菌,2005(6):16-17.
- [2] 郭树凡,张慧丽.香菇液体菌种生产技术研究[J].中国食用菌,2005(1):38.
- [3] 何野,张小平,谭伟,等.长根菇液体培养条件的研究[J].中国食用菌,2005(6):16-17.
- [4] 曾东方,张小朋,罗雪莲,等.三种药用灵芝摇瓶发酵营养生理的比较研究[J].中国食用菌,2005(3):52.